Journal of Agricultural Machinery

Homepage: https://jame.um.ac.ir

Research Article
Vol. 14, No. 4, 2024, p. 355-366

Synergistic Effect of Atmospheric Pressure Cold Plasma and Hydrogen Peroxide as an Efficient Approach for the Control of Citrus Postharvest Green Mold

E. Barzanouni[1], H. Sadrnia[2*], F. Sohbatzadeh[3], S. Khodavaisy[4]

1- PhD Student, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
4- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran & Research Center for Antibiotic Stewardship and Antimicrobial Resistance, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: hassan.sadrnia@um.ac.ir)

Received: 15 May 2023 Revised: 13 June 2023 Accepted: 04 July 2023 Available Online: 19 November 2024	**How to cite this article:** Barzanouni, E., Sadrnia, H., Sohbatzadeh, F., & Khodavaisy, S. (2024). Synergistic Effect of Atmospheric Pressure Cold Plasma and Hydrogen Peroxide as an Efficient Approach for the Control of Citrus Postharvest Green Mold. *Journal of Agricultural Machinery, 14*(4), 355-366. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jam.2023.82325.1165

Introduction

Penicillium Digitatum (PD) and Penicillium italicum diseases pose significant economic challenges to citrus fruit production across the globe. The primary aim of this research is to investigate the synergistic effects of low concentrations of H_2O_2 solution combined with transient spark discharge plasma on the inactivation of PD. Additionally, assess the chemical and physical properties. Ultimately, this approach can be presented as an eco-friendly solution for rinsing citrus fruits on an industrial scale.

Materials and Methods

The *Penicillium digitatum* (PD) isolate (ATCC 24692) was obtained from the Tehran Molecular Mycology Laboratory and cultured on Sabouraud Dextrose Agar medium at pH 5.6 and 27°C for 7 days. The initial concentration of spores in the solution was determined using a UV absorption spectrophotometer, set to 0.1 at a wavelength of 420 nm, and the concentration of spores was approximately equivalent to 10^6 spores per milliliter (Palou et al., 2002). In this study, the plasma reactor had a point-to-plane geometry. The high-voltage needle electrode was placed above a Petri dish filled with a microbial solution combined with H_2O_2, while the grounded electrode was immersed in the solution. The distance between the tip of the needle electrode and the surface of the solution was 15 mm. Solutions of 0.05%, 0.1% and 0.5%v/v H_2O_2 (35% soluble in water) were added to the microbial solution before plasma treatment. The final volume of the solution was 5 ml and exposure times were 2.5, 5, 10, and 15 minutes. The reactor was fed with an air flow of 2 l/min. A transient spark discharge was generated, characterized by a discharge voltage of approximately 18 kV, short durations of less than 100 ns, and high current pulses exceeding 1A, with a repetition frequency ranging from 0.5 to 10 kHz. After treatment, H_2O_2, NO_2^-, and NO_3^- as the main long-lived species in plasma-activated solution are measured. Also, physical factors such as electrical conductivity and pH were measured. Data Analysis performed using SAS 9.4 software.

Results and Discussion

With increasing plasma treatment time and H_2O_2 concentration, the log reduction increased across all treatments. The combination of 0.1 and 0.5% H_2O_2 solution with plasma resulted in complete inactivation of *P.*

https://doi.org/10.22067/jam.2023.82325.1165

digitatum within just 15 minutes. In plasma-treated solutions, regarding chemical properties, the concentrations of H_2O_2, NO_2^-, and NO_3^- increased linearly with the treatment time. Furthermore, the electrical conductivity increased linearly, with a notable acceleration in the treated 0.5% H_2O_2 solution, reaching 373μS cm^{-1}. Additionally, pH value dropped from an initial value of 6.95, using distilled water as a control, to a low of 2.14 for plasma treated with 0.5% H_2O_2 after 15 min of exposure.

Conclusion

The combined treatment was more effective than the isolated use of hydrogen peroxide solution. H_2O_2 enhances the effectiveness of plsma sterilization without requiring additional power input. Consequently, the synergistic application of atmospheric pressure plasma and H_2O_2 proved to be a promising method for the inactivation of PD. The findings indicate that reactive oxygen species (ROS) significantly contribute to the inactivation of PD cells, as well as the concentration of H_2O_2. Finally, the combination of H_2O_2 solution at 0.1 and 0.5% with cold plasma presents an environmentally friendly method for sanitizing citrus fruits.

Acknowledgment

This work was supported by the Ferdowsi University of Mashhad [Grant number 48527]. The authors greatly appreciate the technical support from Mazandaran University in Iran, particularly from the Department of Atomic and Molecular Physics.

Keywords: Hydrogen peroxide, Non-thermal plasma, Penicillium digitatum, Plasma-activated solution, Transient spark discharge

نشریه ماشین‌های کشاورزی
https://jame.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۴، شماره ٤، زمستان ۱٤۰۳، ص ۳٦٦-۳۵۵

اثر ترکیبی پلاسمای سرد فشار اتمسفری و پراکسید هیدروژن به‌عنوان یک رویکرد کارآمد برای کنترل کپک سبز پس از برداشت مرکبات

عصمت برزنونی[۱]، حسن صدرنیا[۲*]، فرشاد صحبت‌زاده[۳]، صادق خداویسی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۳

چکیده

کپک سبز و آبی عوامل محدودکننده دوره انبارداری بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها از جمله مرکبات می‌باشد. در این تحقیق اثر پلاسمای سرد فشار اتمسفری تولیدشده توسط تخلیه اسپارک گذرا جریان مستقیم در یک راکتور بسته بر روی سوسپانسیون قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم بررسی شد. سوسپانسیون با غلظت‌های اولیه متفاوت شامل: صفر، پنج صدم، یک دهم و پنج دهم درصد پراکسیدهیدروژن در زمان‌های مختلف معرض پلاسما ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه تحت پلاسمادهی قرار داده شدند. نتایج نشان داد که با افزایش زمان پلاسمادهی و نیز غلظت پراکسیدهیدروژن محلول اثر غیرفعال‌سازی اسپورهای قارچ افزایش یافت. در غلظت‌های یک و پنج دهم درصد میزان توقف کامل اسپورها در زمان ۱۵ دقیقه پلاسمادهی مشاهده شد. پلاسمادهی توانست سبب افزایش اکسیداسیون محلول شده و در نتیجه منجر به مرگ سلولی بیشتر اسپورها شد. بنابراین استفاده از پلاسمای سرد موجب می‌شود که استفاده از محلول‌های با غلظت بالای پراکسیدهیدروژن در هنگام شستشوی میوه‌ها و سبزی‌ها به‌منظور حفظ خواص پس از برداشت آن‌ها در مقیاس صنعتی اجتناب شود.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، پلاسمای غیرحرارتی، پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم، تخلیه اسپارک گذرا، محلول فعال‌شده با پلاسما

مقدمه

کپک سبز[۵] و کپک آبی[۶] از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای پس از برداشت مرکبات و نیز مشکل‌ساز از لحاظ اقتصادی در تمام مناطق تولیدکننده در جهان هستند. ضایعات واقعی ناشی از کپک‌های پنی‌سیلیوم به عوامل آب و هوایی و باغ، نوع رقم مرکبات، آسیب فیزیکی در حین برداشت و حمل و نقل، اثربخشی تیمارهای ضد قارچی و همچنین محیط پس از برداشت بستگی دارد (Smilanick, Brown, & Eckert, 2006). متیل بروماید یک آفت‌کش موثر و پرکاربرد در برابر انواع آفات از جمله کپک‌ها (قارچ) بود اما از سال ۲۰۰۵، تحت عنوان "پروتکل مونترال در مورد موادی که لایه ازون را تخریب می‌کنند" به دلیل پتانسیل بالای آن در تخریب لایه ازون ممنوع شد (Ito, Ohta, & Hori, 2012). علاوه بر این، قارچ‌کش‌هایی مانند ایمازالیل، سدیم ارتوفنیل فنات یا تیابندازول این بیماری‌ها را کنترل می‌کنند. با این حال، نگرانی‌های زیادی درباره مقاومت و نیز پسماند ناشی از استفاده این مواد وجود دارد. همچنین از عملیات حرارتی مانند غوطه‌وری در آب گرم، برس زدن با آب گرم و نیز هوای گرم استفاده می‌شود، اما گرما می‌تواند باعث تغییر رنگ و کاهش وزن میوه‌ها شود. هرچند تیمارهای فیزیکی به دلیل ضایعات کمتر و سازگاری بیشتر با محیط‌زیست به روش‌های شیمیایی ترجیح داده می‌شوند. تیمار پلاسمای سرد به‌عنوان یک روش فیزیکی غیرحرارتی، دوستدار محیط‌زیست، مقرون به‌صرفه و نیز با بهره‌وری

۱- دانشجوی دکترای گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- دانشیار گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- استاد گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۴- دانشیار گروه بیولوژی مولکولی و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: hassan.sadrnia@um.ac.ir
https://doi.org/10.22067/jam.2023.82325.1165
5- *Penicillium Digitatum*
6- *Penicillium Itaticum*

بالای انرژی و غیره در سال‌های اخیر محبوبیت بیشتری در صنایع کشاورزی و غذا توسعه یافته است. پلاسمای سرد یک فناوری جدید بر پایه یونیزاسیون گازها می‌باشد که با اعمال روش‌های مختلف انرژی به گازها ایجاد می‌شود (Misra *et al*., 2015; Misra, Schlüter, & Cullen, 2016). پلاسمای سرد در دو روش غیرتعادلی و تعادلی تقسیم‌بندی می‌شود که امروزه فرایند پلاسمای سرد غیرتعادلی برای غیرفعال‌کردن میکروارگانیسم‌ها کاربرد زیادی دارد. فاکتورهای مختلفی مانند امواج ماراُبنفش UV-C، گونه‌های خنثی و باردار، میدان‌های الکتریکی و اثرات ترکیبی آن‌ها ممکن است سبب غیرفعال شدن میکروارگانیسم‌ها شوند. همچنین از مزایای این نوع پلاسما دمای پایین فرایند و زمان کوتاه تیماردهی است (Ito, Oh, Ohta, Shiratani, & Hori, 2018).

در سال‌های اخیر علاقه زیادی درباره تاثیر تیمار ترکیبی پلاسمای سرد اتمسفری با روش‌های دیگر در زمینه کشاورزی و صنایع غذایی دیده شده است. اما برای مثال تا به حال، تقریباً هیچ تحقیقی در مورد غیرفعال‌کردن پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم با استفاده از تیمار ترکیبی پلاسمای سرد و پراکسیدهیدروژن[1] صورت نگرفته است. تحقیقات موجود تنها توسط پلاسمای سرد فشار اتمسفری انجام شده است. در پژوهشی با استفاده از پلاسمای آرگون فشار اتمسفری غیرتعادلی روی پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم نشان دادند که شدت غیرفعال‌سازی با پرتوهای UV-C و گونه‌های واکنش‌پذیر تقریباً ۷ برابر بیشتر از میزان تولیدشده توسط پرتوهای UV-C به‌تنهایی است. روند غیرفعال‌سازی با افزایش جریان O_2 افزایش یافت. همچنین با مقایسه D- Value (زمان لازم برای کاهش یک واحد لگاریتم) در رطوبت ۳۵ و ۱۰۰ درصد مشخص شد که رادیکال OH نیز گونه مهمی برای از بین بردن اسپورها است (Ohta, Ito, Iseki, & Hori, 2010). در یک تحقیق مشابه دیگر از پلاسمای Ar/O_2 برای غیرفعال کردن پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که سهم تشعشات UV-C و ازون غالب نیستند، بلکه اکسیژن اتمی سهم عمده‌ای در غیرفعال شدن داشت. رفتار سرعت غیرفعال شدن اسپورها به تراکم O (3Pj) بستگی دارد (Iseki *et al*., 2011). در مطالعه دیگری، اثر جت پلاسمای آب-هوا بر بافر نمکی بافر فسفات ۳ میلی‌لیتری روی پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم نشان داد که ۹۱ درصد از سرعت بازداری جوانه‌زنی در ولتاژ اعمالی ۶ کیلوولت و نسبت بخار آب ۱۰۰ درصد در ۹ دقیقه زمان پلاسمادهی به‌دست آمد (Liu, Wang, Hu, Lei, & Han, 2016). همچنین ضدعفونی پلاسمای تخلیه سد دی‌الکتریک با ولتاژ ۱۰ کیلوولت و بسامد ۱۱-۹ کیلوهرتز برای غیرفعال کردن اسپورهای کپک سبز روی نارنگی انشو در شرایط محیط بررسی شد. نتایج طیف‌سنجی نشان داد شدت بالای باند مثبت نیتروژن و همچنین رادیکال اکسیژن اتمی در ۷۷۷ نانومتر به‌عنوان عامل مهم در غیرفعال‌سازی اسپور پنیسیلیوم دیجیتاتوم شناخته شد. بالاترین کاهش بار میکروبی لگاریتمی تقریباً دو واحد در زمان تیمار سه ثانیه بود. همچنین اثر ضخامت دی‌الکتریک سیلیکون که از ۰/۰۵ تا ۰/۳ میلی‌متر برای ضدعفونی اسپور قارچ روی سطح میوه واضح نبود اما بیان کردند که ضخامت دی‌الکتریک بیشتر از یک میلی‌متر اثر بر ضدعفونی قارچ داشته باشد (Yagyu *et al*., 2016). در تحقیقی دیگر با استفاده از تخلیه کرونایی جت پلاسما با ولتاژ خروجی ۸ کیلوولت و جریان مستقیم ۲ تا ۴ آمپر روی میوه کامکوات، بار میکروبی لگاریتمی در جریان دو، سه و چهار آمپر به‌ترتیب ۰/۷۷ تا ۱/۰۴، ۱/۰۸ تا ۱/۵۷ و ۱/۵۱ کاهش یافت. همچنین تیمار پلاسما تفاوت معناداری در مزه، طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی ایجاد نکرد و سبب افزایش عمر ماندگاری میوه‌ها نسبت به نمونه‌های کنترل شد (Puligundla, Lee, & Mok, 2018).

تیمارهای پس از برداشت میوه‌ها با پراکسید هیدروژن به‌عنوان جایگزینی برای تیمارهای شیمیایی پیشنهاد شده است. این ماده به دو شکل مایع و گاز برای کاربردهای نگهدارنده، ضدعفونی و استریل‌کردن استفاده می‌شود که بر اساس برنامه ملی ارگانیک استفاده از آن در تولید محصولات ارگانیک مجاز است (NOP, 2003). ایالات متحده H_2O_2 را به‌عنوان یک ماده ایمن (GRAS)[2] برای تیمار جایگزین پس از برداشت مواد شیمیایی به‌منظور افزایش ماندگاری میوه‌ها و سبزیجات پذیرفت (Suslow, 1997). پراکسیدهیدروژن توانایی تولید عوامل اکسیدکننده سیتوتوکسیک مانند رادیکال‌های هیدروکسیل را دارد که غشای سلولی، بیومولکول‌ها و DNA میکروارگانیسم‌ها را اکسید می‌کند، بنابراین دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضدقارچی می‌باشد. محلول‌های H_2O_2 با غلظت کم (معمولاً از ۱تا ۵ درصد) برای ضدعفونی در مواد غذایی و بسته‌بندی استفاده می‌شود (Parish *et al*., 2003). بنابراین هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر ترکیبی غلظت‌های پایین محلول H_2O_2 و پلاسمای سرد فشار اتمسفری اسپارک گذرا برای غیرفعال کردن پنیسیلیوم دیجیتاتوم در محیط آبی است، که در نهایت بتواند روش جایگزینی برای شستشو مرکبات به‌جای استفاده از قارچ‌کش‌ها و یا مواد شیمیایی باشد.

مواد و روش‌ها

اعمال تیمار پلاسمای فشار اتمسفری هوا بر محلول قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم

در این پژوهش از سیستم پلاسمای سرد هوای فشار اتمسفری

1- H_2O_2

2- Generally recognized as safe

تخلیه اسپارک گذرا متشکل از الکترود میله‌ای نازک ولتاژ بالا از جنس تنگستن که در فاصله ۱۵ میلی‌متر از سطح محلول و همچنین الکترود حلقوی زمین در کف پتری‌دیش بود، استفاده شد (شکل ۱). محلول در حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر و با چهار غلظت ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و صفر پراکسیدهیدروژن از محلول ۳۵درصد حجمی H_2O_2 (محلول در آب، شماره CAS:7722-84-1، ایران) تهیه شد. همچنین زمان پلاسمادهی ۲/۵، ۵ و۱۰ و ۱۵ دقیقه بود. در این چینش آزمایشی تخلیه پلاسمای اسپارک گذرا[1] توسط یک منبع تغذیه ولتاژ بالای جریان مستقیم با ولتاژ تخلیه حدود ۱۸ کیلوولت و پالس جریان بیشتر از یک آمپر با فرکانس ۰/۵ تا ۱۰ کیلوهرتز انجام شد. همچنین برای تولید و حفظ یکنواختی پلاسمای تخلیه از یک مقاومت بالاست ۱۱/۲ مگااهمی استفاده شد. دبی جریان هوای ورودی به راکتور ۲ لیتر بر دقیقه بود. سیگنال ولتاژ تخلیه توسط پروب ولتاژ (SEW PD-28) و سیگنال جریان تخلیه توسط نمایشگر جریان (Pearson 4100) متصل به اسیلوسکوپ مدل (Tektronix DPO2012) اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام آزمون‌های میکروبی

برای انجام آزمون‌های میکروبی سویه پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم (ATCC 24692) از آزمایشگاه قارچ‌شناسی مولکولی تهران تهیه شد. سپس بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (Ibresco, Iran) در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز کشت داده شد. پس از تهیه محلول، غلظت اولیه اسپورها توسط اسپکتروفوتومتر مدل (آمریکا، WPA Biowave II) اندازه‌گیری شد. جذب سوسپانسیون در طول موج ۴۲۰ نانومتر روی ۰/۱ تنظیم شد که معادل 10^6 اسپور قارچ در یک میلی‌لیتر بود (Palou, Usall, Smilanick, Aguilar, & Vinas, 2002). سپس با افزودن پراکسیدهیدروژن در غلظت‌های مورد بررسی به محلول قارچی حجم ۵ میلی‌لیتر را آماده نموده و تحت تیمار پلاسما قرار داده شد. پس از تیماردهی، محلول با رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ انجام و در نهایت ۲۰ میکرولیتر روی محیط آگارکشت داده شد و به مدت ۳ روز در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت شمارش بار میکروبی بر حسب کلونی تشکیل‌یافته در میلی‌لیتر ($CFU\ mL^{-1}$) بیان شد.

خواص شیمیایی و فیزیکی آب مقطر فعال‌شده با پلاسما

پراکسید هیدروژن، یون‌های نیتریت و نیترات گونه‌های اصلی با عمر طولانی در محلول فعال‌شده با پلاسما هستند که اثرات بالقوه مهمی بر غیرفعال‌کردن میکروارگانیسم‌ها دارند. در این پژوهش، غلظت این گونه‌ها با استفاده از طیف‌سنج ماوراء بنفش (TUV-Vis Philler Scientific SU100، ساخت ایران) بر اساس روش شرح داده شده در مقاله لیو و همکاران (Liu *et al*., 2019) اندازه‌گیری شد. محلول‌های استاندارد H_2O_2، $NaNO_2$ و $NaNO_3$ رقیق‌شده به غلظت‌های مختلف استفاده شد و جذب آن‌ها برای کالیبراسیون H_2O_2، NO_2^- و NO_3^- اندازه‌گیری شد. با افزودن معرف Amplex® Red به آب پلاسمایی، غلظت H_2O_2 از طریق واکنش آن با معرف تعیین شد و محصول اکسیداسیون قرمز فلورسنت در طول موج λ = ۵۹۵ نانومتر ساطع شد. غلظت NO_2^- با استفاده از معرف گریس اندازه‌گیری شد، پیک جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد در نهایت، آنزیم ردوکتاز نیترات و معرف گریس برای اندازه‌گیری مجموع غلظت NO_2^- و NO_3^- به آب تیمارشده با پلاسما در همان طول موج افزوده شد. در پایان، غلظت NO_3^- با کم کردن غلظت NO_2^- از غلظت کل به‌دست‌آمد. همچنین فاکتورهای فیزیکی مانند هدایت الکتریکی و اسیدیته به‌ترتیب با رسانایی‌سنج الکتریکی (Bante، ساخت چین) و مولتی‌متر (PET103، ساخت ایران) اندازه‌گیری شد.

طیف‌سنجی نشر نوری[2] پلاسما

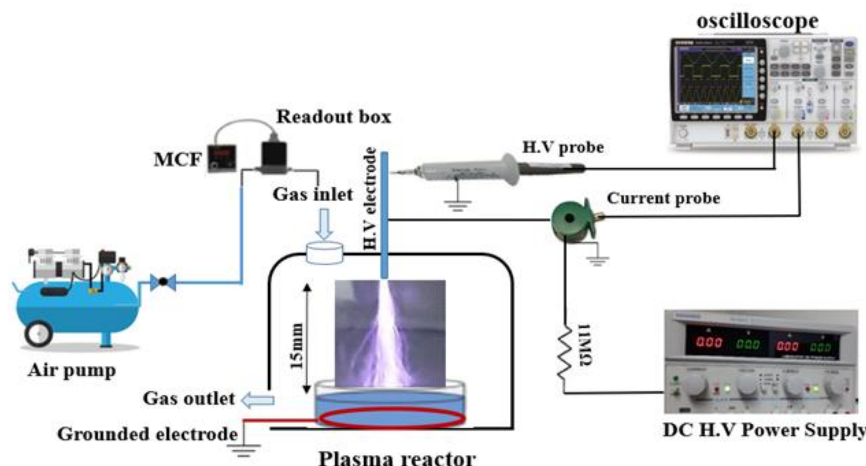
یک طیف انتشار منحصر به‌فرد خاص برای فوتون‌های ساطع‌شده و گونه‌های فعال (مولکول‌ها، اتم‌ها و یون‌ها) در حجم تخلیه پلاسمای تولیدشده در شرایط اتمسفری، که برای از بین بردن قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم مهم هستند، با طیف‌سنجی نشر نوری شناسایی شد. طیف انتشار یک پلاسمای هوای فشار اتمسفر با و بدون پتری‌دیش حاوی محلول توسط طیف‌سنج نوری (UV-Vis ،S100 spectrometer, Solar laser systems) با آرایه آشکارساز CCD 3648 پیکسل و فاصله کانونی ۷۵ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. فیبر نوری در فاصله ۵ میلی‌متری از تخلیه الکتریکی تولیدشده قرار گرفت. طیف انتشار نوری با زمان ادغام ۸۲ ثانیه و وضوح ۰/۵ نانومتر در محدوده طیفی ۲۵۰ تا ۹۰۰ نانومتر ثبت شد.

روش آماری تحلیل نتایج

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین با روش آزمون LSD با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. محاسبات میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ انجام شد.

1- Transient spark discharge

2- Optical Emission Spectroscopic



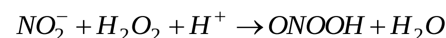
شکل ۱- چینش آزمایشی

Fig.1. Experimental setup

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی بار میکروبی

اثر ضدقارچی غلظت‌های مختلف محلول پراکسیدهیدروژن در برابر قارچ پنی‌سیلیوم در شکل ۲ نشان داده شده است. پلاسما تاثیر معناداری در سطح یک درصد بر غیرفعال‌سازی میکروبی وجود داشت ($p<0.01$). با افزایش زمان پلاسمادهی و افزایش غلظت H_2O_2، کاهش بار میکروبی در تمام تیمارها افزایش یافت، به‌طوری‌که محلول ۰/۱ و ۰/۵ درصد پراکسیدهیدروژن تحت پلاسما در زمان۱۵ دقیقه منجر به توقف کامل رشد اسپورهای قارچ شد، در حالی‌که کاهش لگاریتمی محلول با غلظت‌های صفر و ۰/۰۵ درصد به‌ترتیب ۲/۴۵ و ۳/۰۳ بود. همچنین در تیمارهای بدون پلاسما (یعنی اثر H_2O_2 به‌تنهایی) با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۵، کاهش لگاریتمی بار میکروبی به‌ترتیب ۰/۷۴ و ۱/۲۵ در زمان ۱۵ دقیقه مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد پلاسما با افزودن H_2O_2 بهبود یافته است. این تاثیرگذاری بیشتر را به احتمال زیاد می‌توان به آسیب اکسیداسیون ناشی از گونه‌های اکسیژن واکنشی تولیدشده در پلاسما نسبت داد (Puligundla *et al.*, 2018; Timoshkin *et al.*, 2012). این نتایج بیان می‌کند که پراکسیداسیون غشای سلولی از طریق گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر یک مکانیسم مهم در خواص بیولوژیکی پلاسما است، در حقیقت واکنش بین هیدروژن در پراکسید هیدروژن و یون نیتریت پس از پلاسمادهی ممکن است منجر به تشکیل پراکسی نیتریت طبق واکنش زیر شود (Hao *et al.*, 2014):

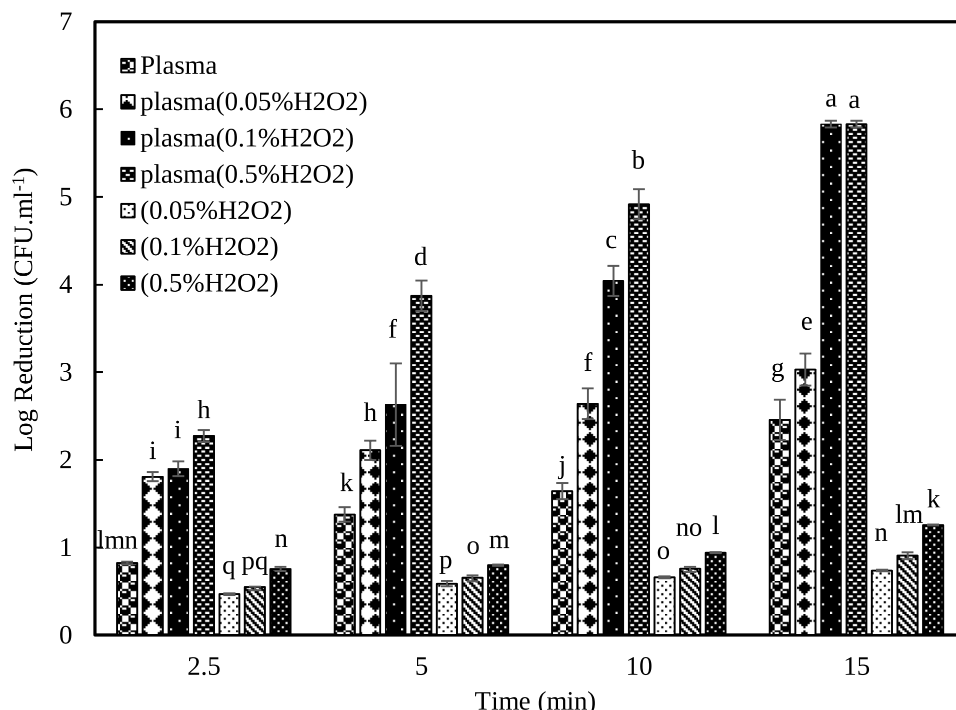


$$NO_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow ONOOH + H_2O$$

علاوه بر این نشان داده شده است که شیمی پراکسی نیتریت به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در خواص ضدمیکروبی آب پلاسما شده نقش دارند (Naïtali, Kamgang-Youbi, Herry, Bellon-Fontaine, & Brisset, 2010; Traylor *et al.*, 2011).

خواص شیمیایی و فیزیکی آب پلاسمایی‌شده

به‌منظور مطالعه دقیق‌تر مکانیسم‌های موثر در غیرفعال‌سازی پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم، اثرات شیمیایی و فیزیکی آب پلاسمایی‌شده بررسی شد. تحلیل داده‌ها نشان داد که تاثیر فاکتور زمان مواجه با پلاسما بیشتر از غلظت محلول بود (داده‌ها نشان داده نشده است). همان‌طوری‌که نمودارهای شکل ۳ نشان داده شده است در همه محلول‌های تحت پلاسما، غلظت H_2O_2، NO_2^- و NO_3^- به‌صورت خطی با گذشت زمان تیمار افزایش یافت. حداقل غلظت H_2O_2 در محلول با غلظت صفر برابر ۴/۱ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲/۵ دقیقه، در حالی‌که حداکثر غلظت ۳۱/۰۳ میلی‌گرم در لیتر در محلول ۰/۵ درصد و در زمان ۱۵ دقیقه پلاسمادهی مشاهده شد شکل ۳ (a). لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2016) گزارش کردند که ۳/۰۸۰۹ میکرومول در لیتر H_2O_2 تولیدشده در سیستم جت‌پلاسما سبب ممانعت از رشد اسپورهای پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم تا ۹۱ درصد شد. پراکسیدهیدروژن به‌عنوان یک اکسیدکننده قوی نقش مهمی در ضدعفونی دارد. علاوه بر این، NO_2^- و NO_3^- و پراکسی‌نیتریت‌های تولیدشده در محلول‌های تحت پلاسما به دلیل مکانیسم آن‌ها در ضدعفونی مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته است (Lee, Paek, Ju, & Lee, 2006; Shen *et al.*, 2016).



شکل ۲- غیرفعال‌سازی پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم با غلظت‌های مختلف محلول پراکسیدهیدروژن و زمان‌های مختلف پلاسما

Fig.2. Inactivation of *Penicillium digitatum* with different concentrations of H_2O_2 solutions and different plasma treatment times

شکل ۳ (b) و (c) نشان داد که میزان غلظت‌های NO_2^- و NO_3^- تولیدشده در زمان پلاسمادهی روند مشابهی در همه محلول‌ها داشتند به طوری‌که با افزایش زمان و غلظت افزایش یافتند. مقدار NO_2^- در محلول‌ها با غلظت صفر و نیم درصد به‌ترتیب ۱/۹۹ و ۱۲/۹۸ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب در تیمار ۲/۵ و ۱۵ دقیقه مشاهده شد. همچنین حداکثر میزان تولید NO_3^-، در طول مواجهه با پلاسما، ۴۶/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر که مربوط به تیمار با غلظت ۰/۵ درصد H_2O_2 بود، در حالی‌که کمترین مقدار ۱۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر برای محلول بدون H_2O_2 در زمان ۲/۵ دقیقه بود. نیترات به‌عنوان یک محصول ثانویه با عمر طولانی در فرایند پلاسمادهی دارای اثرات بیولوژیکی است. بیشتر گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنش‌پذیر تولیدشده در پلاسمای ترکیبی با H_2O_2 عمدتاً OH و NO بودند (Graves, 2012). که در نتیجه منجر به تولید بیشتر در تشکیل سایر گونه‌های واکنشی مانند O=NOOH و NO_2 می‌شود (Wu *et al.*, 2017). این رادیکال‌ها می‌توانند به آسانی به اسیدهای چرب غیراشباع غشای سلولی حمله کرده و با نفوذ درون سلولی موجب اختلال در DNA می‌شوند. به‌طور خلاصه در طول پلاسمادهی آب، رادیکال OH از طریق جدایش مولکول‌های آب طبق رابطه (۱) تولید می‌شود (Bekeschus *et al.*, 2014):


$$H_2O + P \rightarrow OH + H + P \quad (۱)$$

که P یک ذره دارای انرژی از پلاسما (برای مثال: الکترون) (Bruggeman & Schram, 2010). با افزودن H_2O_2، بیشتر OH ممکن است از H_2O_2 و از طریق واکنش‌های (۲) تا (۴) ایجاد شوند (Lee *et al.*, 2013).


$$e^- + H_2O_2 \rightarrow e^- + 2OH \quad (۲)$$


$$O + H_2O_2 \rightarrow OH + HO_2 \quad (۳)$$


$$e^- + H_2O_2 \rightarrow OH + OH^- \quad (۴)$$

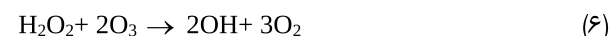
همچنین، ارتباط ازون (تولیدشده توسط پلاسما از رابطه (۵) و پراکسیدهیدروژن می‌تواند به‌طور مطلوبی OH تولید کند رابطه (۶)، که فرایند پراکسون نامیده می‌شود (Merenyi, Lind, Naumov, & Sonntag, 2010).

شکل ۳– غلظت‌های H_2O_2، NO_2^- و $NO3^-$ در محلول تحت پلاسما در زمان‌های مختلف

Fig.3. Concentrations of different plasma treatment times of H_2O_2 solutions (a) H_2O_2, (b) NO_2^-, and (c) $NO3^-$



$O_2 + O \rightarrow O_3$ (۵)



$H_2O_2 + 2O_3 \rightarrow 2OH + 3O_2$ (۶)

وجود H_2O_2 منجر به تولید بیشتر تبدیل رادیکال O_2^- بـه OH شده و از تولید $^1O_2$ جلوگیری می‌کند، بنـابراین نقـش OH می‌توانـد خیلی مهم باشـد. اگرچـه، رادیکال‌هـای O_2^- و $^1O_2$ در ایـن سیسـتم وجود خواهند داشت و نقش متناظر خود را در ضدعفونی ایفا می‌کنند. اخیراً گونه‌های فعال نیتروژن در پلاسمای سرد، عمـدتاً رادیکال‌هـای اکسید نیتریک و نیترات هستند. نیتریت از واکنش‌هـای جـدایش N و O بر طبق رابطه‌های (۷) تا (۹) تولید می‌شود:



$N_2 + e^- \rightarrow 2N + e^-$ (۷)



$O_2 + e^- \rightarrow 2O + e^-$ (۸)



$N + O \rightarrow NO$ (۹)

به‌عنوان یـک رادیکـال، NO در حـال تـلاش بـرای واکـنش بـا گونه‌های دیگر با یک الکترون جفت‌نشده است، طول عمر NO عملاً تنها با برخورد تصادفی با دیگر رادیکال‌هـا محـدود مـی‌شـود. NO و سوپراکسید به سهولت واکنش داده و پراکسـی‌نیتریت تولیـد می‌شـود (Merenyi *et al*., 2010):



$+NO \rightarrow ONOO^- O_2^-$ (۱۰)

در محیط محلول اسیدی، پراکسی‌نیتریت به سرعت پروتونه شـده تا اسید پروکسی نیتروس را تشکیل دهد:

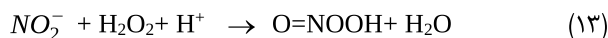

$$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \quad (۱۱)$$

واکنش تعادلی بین پروکسی‌نیتریت و پراکسی‌نیتروس اسید بستگی به مقدار اسیدیته دارد. تحت شرایط فیزیولوژیکی برای مثال برای مقدار اسیدیته نزدیک ۷ هم پروکسی‌نیتریت و هم شکل پروتونه‌شده آن در غلظت‌های قابل‌توجهی وجود خواهند داشت (Van Gils, Hofmann, Boekema, Brandenburg, & Bruggeman, 2013).

NO ممکن است همچنین با اکسیژن محلول واکنش داده و یون‌های نیتریت و نیترات طبق واکنش کلی رابطه (۱۲) تشکیل شود:


$$4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_2^- + 4H^+ \quad (۱۲)$$

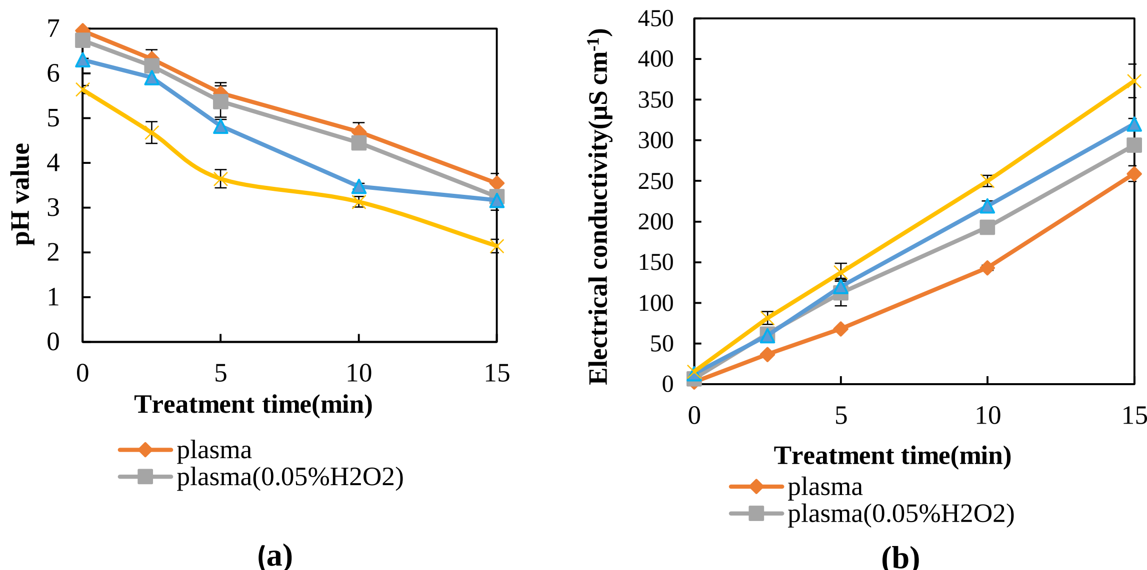
تشکیل نیترات‌ها تحت شرایط اسیدی ممکن است از طریق واکنش نیترات‌ها با پراکسیدهیدروژن منجر به تشکیل پروکسی‌نیتریت‌ها با استفاده از واکنش (۱۳) شود (Maeda, Igura, Shimoda, & Hayakawa, 2003):


$$NO_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O{=}NOOH + H_2O \quad (۱۳)$$

و نکته مهم این‌که ONOOH می‌تواند بیشتر واکنش نشان دهد و OH و NO_2 را مانند رابطه (۱۴) تشکیل دهد:


$$O = NOOHOH + NO_2 \bullet \quad (۱۴)$$

بنابراین افزودن H_2O_2 به بازده بالاتر OH و NO کمک نموده و همچنین ممکن است سبب کارایی بیشتر سایر گونه‌های فعال مانند O=NOOH و NO_2 از طریق واکنش‌های فوق ذکر شود، که در نتیجه منجر به غیرفعال‌شدن بیشتر قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم می‌شود.



شکل ٤- تغییرات اسیدیته و هدایت الکتریکی در غلظت‌های مختلف محلول تحت پلاسما

Fig.4. Changes of (a) pH value and (b) Electrical conductivity of various concentrations of H_2O_2 solution treated by cold plasma

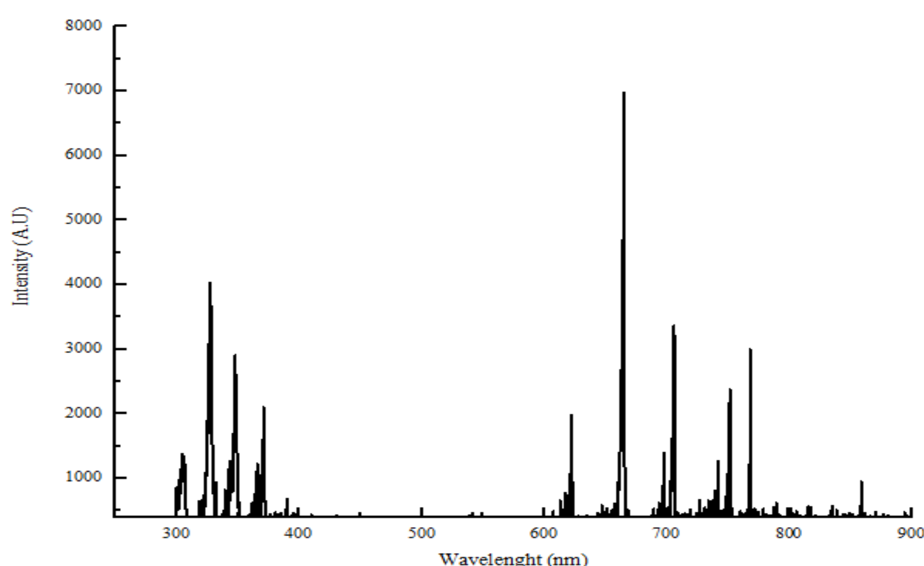
با توجه نتایج داده‌های ویژگی‌های فیزیکی اندازه‌گیری‌شده در شکل ۴ (a) میزان اسیدیته در تمام تیمارها با افزایش زمان پلاسمادهی در نتیجه تشکیل نیتریت، نیترات و اسیدی شدن محلول کاهش یافت. این گونه‌های شیمیایی در نتیجه کاهش دادن اسیدیته موجب فعالیت ضدمیکروبی آب پلاسمایی می‌شوند (Ma *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016) کمترین مقدار اسیدیته در محلول با غلظت ۰/۵ درصد تحت پلاسما، ۲/۱۴ بود. وارگناو و همکاران (Wargenau *et al.*, 2011) بیان کردند که pH پایین می‌تواند بر خواص الکترواستاتیکی اسپورهای قارچ تأثیر بگذارد، یعنی احتمالاً سبب پراکنده شدن اسپورها در حجم مایع شده، که می‌تواند بر گسترش هیف‌ها، میسلیوم‌ها تأثیر منفی بگذارد و از رشد قارچ جلوگیری کند.

همان‌طوری که در شکل ۴ (a) مشاهده می‌شود میزان اسیدیته از مقدار ۶/۹۵ (آب مقطر به‌عنوان شاهد) به پایین‌ترین مقدار ۲/۱۴ بعد از ۱۵ دقیقه پلاسمادهی محلول نیم درصد H_2O_2 رسید. به‌طور مشابه در همان زمان ۱۵دقیقه آب مقطر تحت پلاسما میزان pH به ۳/۵۴ بود. بنابراین سرعت کاهش pH با افزودن H_2O_2 بیشتر شد. همچنین ثابت شده است که pH یک عامل کلیدی است که به غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کند. کاهش اسیدیته مربوط به واکنش‌های متعدد حاصل از NOx, O و O_3 در پلاسمای هوا با آب

در فصل مشترک گاز- آب انجام می‌شود، است (Liu *et al*., 2010). در واقع pH پایین‌تر عمدتاً در نتیجه تولید اسید نیتریک از NO تولیدشده در پلاسما، است (Park, Ryu, Hong, Choi, & Uhm, 2012) با این حال، افزودن H_2O_2 باعث کاهش زمان غیرفعال‌شدن اسپورها شد (شکل ۲). در ارتباط با هدایت الکتریکی، این پارامتر فیزیکی به‌صورت خطی افزایش یافت، که افزایش آن در بالاترین زمان پلاسمادهی و غلظت محلول ۳۷۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر مشاهده شد. این بیان می‌کند که تجمع یون‌ها با افزایش زمان تیماردهی، افزایش یافت شکل ۴ (b).

نتایج طیف‌سنجی نشر نوری

طیف نشر نوری پلاسمای هوای اتمسفری اسپارک گذرا در محدوده ۲۵۰ تا ۹۰۰ نانومتر در شکل ۵ نشان داده شده است. مهم‌ترین خطوط طیفی ثبت‌شده شامل نیتروژن دو بار مثبت با طول‌موج‌های ۳۱۴، ۳۳۵، ۳۵۶، ۳۷۹ نانومتر، نیتروژن یک بار مثبت با طول‌موج‌های تابشی ۳۹۹ و ۳۹۰ نانومتر مشاهده گردید. همچنین طول‌موج تابشی از رادیکال‌های اکسیژن در خطوط ۶۶۵، ۷۷۷ و ۸۴۴ نانومتر نیز ثبت شد. فاکتورهای غیرفعال‌سازی که از طیف‌سنجی موردتوجه است شامل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن مانند OH ،O و O_3. رادیکال اتمی اکسیژن موثرترین عامل در توقف رشد اسپورها بود که توسط محققین دیگری نیز تایید شده است (Iseki *et al*., 2011; Yagyu *et al*., 2016).



شکل ۵- طیف‌سنجی نشر نوری پلاسمای هوا

Fig.5. Typical optical emission spectrum of air plasma

نتیجه‌گیری

در حالت کلی با افزایش زمان پلاسمادهی، کاهش بار میکروبی در تیمارهای ترکیبی مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری در اثر غیر فعال‌سازی اسپورها بین تیمارهای با و بدون پلاسما وجود داشت. با این حال، تیمار ترکیبی موثرتر از استفاده جداگانه از محلول پراکسید هیدروژن بود. محلول‌های H_2O_2 بدون افزایش توان ورودی دارای اثرات بازدارندگی بیشتری روی رشد اسپورها داشتند. در نتیجه، درمان ترکیبی پلاسمای فشار اتمسفر و H_2O_2 یک روش امیدوارکننده برای غیرفعال کردن قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم بود. نتایج طیف‌سنجی نشان داد که گونه‌های اکسیژن واکنشی نقش مهمی در غیرفعال‌کردن سلول‌های قارچی علاوه بر غلظت H_2O_2 داشتند. در نهایت، محلول ترکیبی H_2O_2 با غلظت ۰/۱ و ۰/۵درصد با پلاسمای سرد می‌تواند به‌عنوان یک روش ضدعفونی کردن سازگار با محیط‌زیست برای شستشوی مرکبات معرفی شود.

مشارکت نویسندگان

عصمت برزنونی: جمع‌آوری داده‌ها، پردازش داده‌ها، تحلیل آماری، خدمات نرم‌افزاری، تصویرسازی نتایج، استخراج و تهیه متن اولیه، شبیه‌سازی کامپیوتری

حسن صدرنیا: نظارت و مدیریت
صادق خداویسی: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، مشاره فنی
فرشاد صحبت‌زاده: نظارت و مدیریت، مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، مشاوره فنی، ویرایش متن، شبیه‌سازی کامپیوتری

References

1. Bekeschus, S., Kolata, J., Winterbourn, C., Kramer, A., Turner, R., Weltmann, K., Bröker, B., & Masur, K. (2014). Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free Radical Research*, *48*(5), 542-549. https://doi.org/10.3109/10715762.2014.892937
2. Bruggeman, P., & Schram, D. C. (2010). On OH production in water containing atmospheric pressure plasmas. *Plasma Sources Science and Technology*, *19*(4). https://doi.org/10.1088/0963-0252/19/4/045025
3. Graves, D. B. (2012). The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *45*(26), 263001. https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001
4. Hao, X., Mattson, A. M., Edelblute, C. M., Malik, M. A., Heller, L. C., & Kolb, J. F. (2014). Nitric oxide generation with an air operated non-thermal plasma jet and associated microbial inactivation mechanisms. *Plasma Processes and Polymers*, *11*(11), 1044-1056. https://doi.org/10.1002/ppap.201300187
5. Iseki, S., Hashizume, H., Jia, F., Takeda, K., Ishikawa, K., Ohta, T., Ito, M., & Hori, M. (2011). Inactivation of Penicillium digitatum spores by a high-density ground-state atomic oxygen-radical source employing an atmospheric-pressure plasma. *Applied Physics Express*, *4*(11), 116201. https://doi.org/10.1143/APEX.4.116201
6. Ito, M., Oh, J. S., Ohta, T., Shiratani, M., & Hori, M. (2018). Current status and future prospects of agricultural applications using atmospheric-pressure plasma technologies. Plasma Processes and Polymers, *15*(2), 1700073. https://doi.org/10.1002/ppap.201700073
7. Ito, M., Ohta, T., & Hori, M. (2012). Plasma agriculture. *Journal of the Korean Physical Society*, *60*, 937-943. https://doi.org/10.3938/jkps.60.937
8. Lee, H. W., Lee, H., Kang, S., Kim, H., Won, I., Jeon, S., & Lee, J. (2013). Synergistic sterilization effect of microwave-excited nonthermal Ar plasma, H_2O_2, H_2O and TiO_2, and a global modeling of the interactions. *Plasma Sources Science and Technology*, *22*(5), 055.008. https://doi.org/10.1088/0963-0252/22/5/055008
9. Lee, K. N., Paek, K. H., Ju, W. T., & Lee, Y. H. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *Journal of Microbiology*, *44*(3), 269-275.
10. Liu, F., Sun, P., Bai, N., Tian, Y., Zhou, H., Wei, S., Zhou, Y., Zhang, J., Zhu, W., & Becker, K. (2010). Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct current, cold atmospheric pressure air plasma microjet. *Plasma Processes and Polymers*, *7*(3-4), 231-236. https://doi.org/10.1002/ppap.200900070
11. Liu, K., Wang, C., Hu, H., Lei, J., & Han, L. (2016). Indirect treatment effects of water–air MHCD jet on the inactivation of Penicillium Digitatum suspension. *IEEE Transactions on Plasma Science*, *44*(11), 2729-2737. https://doi.org/10.1109/TPS.2016.2608926
12. Liu, Z., Zhou, C., Liu, D., He, T., Guo, L., Xu, D., & Kong, M. G. (2019). Quantifying the concentration and penetration depth of long-lived RONS in plasma-activated water by UV absorption spectroscopy. *AIP Advances*, *9*(1), 015014. https://doi.org/10.1063/1.5037660
13. Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J., & Fang, J. (2015). Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *Journal of Hazardous Materials*, *300*, 643-651. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.061
14. Maeda, Y., Igura, N., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2003). Bactericidal effect of atmospheric gas plasma on Escherichia coli K12. *International Journal of Food Science and Technology*, *38*(8), 889-892.
15. Merenyi, G., Lind, J., Naumov, S., & Sonntag, C. V. (2010). Reaction of ozone with hydrogen peroxide (peroxone process): a revision of current mechanistic concepts based on thermokinetic and quantum-chemical considerations. *Environmental Science & Technology*, *44*(9), 3505-3507. https://doi.org/10.1021/es100277d
16. Misra, N., Kaur, S., Tiwari, B. K., Kaur, A., Singh, N., & Cullen, P. (2015). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. *Food Hydrocolloids*, *44*, 115-121. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.019
17. Misra, N., Schlüter, O., & Cullen, P. (2016). Plasma in food and agriculture. In *Cold plasma in food and agriculture* (pp. 1-16). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00001-9
18. Naïtali, M., Kamgang-Youbi, G., Herry, J. M., Bellon-Fontaine, M. N., & Brisset, J. L. (2010). Combined effects of long-living chemical species during microbial inactivation using atmospheric plasma-treated water. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(22), 7662-7664. https://doi.org/10.1128/AEM.01615-10
19. NOP. (2003). *National Organic Program, Federal Register*
20. Ohta, T., Ito, M., Iseki, S., & Hori, M. (2010). *Inactivation mechanism of Penicillium digitatum using atmospheric pressure plasma*. TENCON 2010-2010 IEEE Region 10 Conference. https://doi.org/10.1109/TENCON.2010.5685967

21. Palou, L., Usall, J., Smilanick, J. L., Aguilar, M. J., & Vinas, I. (2002). Evaluation of food additives and low toxicity compounds as alternative chemicals for the control of Penicillium digitatum and Penicillium italicum on citrus fruit. *Pest Management Science*, *58*(5), 459-466. https://doi.org/10.1002/ps.477
22. Parish, M., Beuchat, L., Suslow, T., Harris, L., Garrett, E., Farber, J., & Busta, F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *2*, 161-173. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x
23. Park, G., Ryu, Y. H., Hong, Y. J., Choi, E. H., & Uhm, H. S. (2012). Cellular and molecular responses of Neurospora crassa to non-thermal plasma at atmospheric pressure. *Applied Physics Letters*, *100*(6), 063703. https://doi.org/10.1063/1.3684632
24. Puligundla, P., Lee, T., & Mok, C. (2018). Effect of intermittent corona discharge plasma treatment for improving microbial quality and shelf life of kumquat (*Citrus japonica*) fruits. *LWT*, *91*, 8-13. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.019
25. Shen, J., Tian, Y., Li, Y., Ma, R., Zhang, Q., Zhang, J., & Fang, J. (2016). Bactericidal effects against S. aureus and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures. *Scientific Reports*, *6*(1), 28505. https://doi.org/10.1038/srep28505
26. Smilanick, J., Brown, G., & Eckert, J. (2006). The biology and control of postharvest diseases. *Fresh Citrus Fruits*, 339-396.
27. Suslow, T. (1997). Postharvest Chlorination: Basic Properties & Key Points for Effective Distribution.
28. Timoshkin, I. V., Maclean, M., Wilson, M. P., Given, M. J., MacGregor, S. J., Wang, T., & Anderson, J. G. (2012). Bactericidal effect of corona discharges in atmospheric air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, *40*(10), 232. https://doi.org/10.1109/TPS.2012.2193621
29. Traylor, M. J., Pavlovich, M. J., Karim, S., Hait, P., Sakiyama, Y., Clark, D. S., & Graves, D. B. (2011). Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *44*(47), 472001. https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/47/472001
30. Van Gils, C., Hofmann, S., Boekema, B., Brandenburg, R., & Bruggeman, P. (2013). Mechanisms of bacterial inactivation in the liquid phase induced by a remote RF cold atmospheric pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *46*(17), 175203. https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/17/175203
31. Wargenau, A., Fleißner, A., Bolten, C. J., Rohde, M., Kampen, I., & Kwade, A. (2011). On the origin of the electrostatic surface potential of Aspergillus niger spores in acidic environments. *Research in Microbiology*, *162*(10), 1011-1017. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.07.006
32. Wu, S., Zhang, Q., Ma, R., Yu, S., Wang, K., Zhang, J., & Fang, J. (2017). Reactive radical-driven bacterial inactivation by hydrogen-peroxide-enhanced plasma-activated-water. *The European Physical Journal Special Topics, 226*(13), 2887-2899. https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60330-y
33. Xu, D., Wang, B., Xu, Y., Chen, Z., Cui, Q., Yang, Y., Chen, H., & Kong, M. G. (2016). Intracellular ROS mediates gas plasma-facilitated cellular transfection in 2D and 3D cultures. *Scientific Reports*, *6*(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/srep27872
34. Yagyu, Y., Hatayama, Y., Hayashi, N., Mishima, T., Nishioka, T., Sakudo, A., Ihara, T., Ohshima, T., Kawasaki, H., & Suda, Y. (2016). Direct plasma disinfection of green mold spore on citrus by atmospheric pressure dielectric barrier discharge for agricultural applications. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, *41*(1), 127-130. https://doi.org/10.14723/tmrsj.41.127